第 40 卷 第 4 期
1997 年 11 月
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
Vol. 40, No. 4
Nov., 1997

苦豆子生物碱对萝卜蚜的毒力及其对几种酯酶的影响*

罗万春 李云寿 慕立义
(山东农业大学农药毒理与应用技术省级重点实验室 泰安 271018)
赵善欢
(华南农业大学昆虫毒理研究室 广州 510642)

摘要 苦豆子 *Sophora alopecuroids* (L.) 的次生代谢物质为喹诺里西定生物碱类。本研究明确了该生物碱中的野靛碱对萝卜蚜 (*Lipaphis erysimi*) 有很高的毒杀作用，对其无翅成蚜的致死中浓度 (LC_{50}，浸渍法) 为 (432.59±2.12) mg/L，优于著名的杀蚜生物碱毒藜碱和烟碱，两者对该试虫的 LC_{50}分别为 (684.70±2.28) mg/L 和 (1 090.65±2.01) mg/L。用小菜蛾 (*Plutella xylostella*) 幼虫作试虫，得知苦豆子7种主要生物碱对昆虫的乙酰胆碱酯酶 (AChE) 有抑制作用，其抑制程度排序为：总碱＞野靛碱＞槐胺碱＞槐定碱＞槐果碱＞氧化苦参碱＞苦参碱＞苦豆碱。野靛碱和苦豆碱对 α-乙酸萘酯酶、α-乙酸萘酯羧酸酯酶及酯酶同功酶的活性亦表现不同程度的抑制作用。

关键词 苦豆子生物碱，萝卜蚜，毒性，酯酶

在害虫防治中，面对有机合成杀虫剂出现的种种问题，人们越来越认识到植物天然产物对现代农药的研究具有重要意义。苦豆子(*Sophora alopecuroids*)为豆科槐属植物，广泛分布于我国西北地区[1~2]，已从该植物中分离鉴定了20余种生物碱[2~10]，并证明了多种苦豆子生物碱的药理作用和医药用途[1,11~14]。有关苦豆子提取物对害虫的防治作用也散见于一些文献中[15~16]。本研究以苦豆子生物碱为对象，将其对昆虫的毒杀作用及对几种酯酶的影响进行了研究，旨在评价该类生物碱对昆虫的毒性及其可能的作用机理，为从天然植物中寻找具有杀虫作用的物质提供理论根据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与饲养

萝卜蚜 *Lipaphis erysimi* (Katenbach) 用盆栽菜心 *Brassica parachinesis* (Bailey) 在华南农业大学昆虫毒理研究室网室饲养，小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 在该研究室养虫室以菜心实生苗饲养。

* 山东省教委部分资助本项研究
1995-05-31收稿，1996-12-09收修改稿

1.2 生物碱及其毒效测定

本试验所用生物碱名称、产地及纯度见表1。挑取萝卜蚜无翅成蚜采用浸渍法[17]进行毒力测定。死亡率以 Abott 公式进行校正。

1.3 酯酶活性实验方法

酯酶活性实验所用试虫均为小菜蛾幼虫。AChE 活性测定采用 Ellman 提出的乙酰硫代胆碱-二硫双对硝基苯甲酸（ASCh-DTNB）法[18]，挑取在养虫室饲养的4龄小菜蛾幼虫，按每克材料10 mL 蒸馏水的比例在冰浴的玻璃匀浆器中匀浆，然后在760 g 下离心10 min，取上清液作酶源。对α-乙酸萘酯酶及α-乙酸萘酯羧酸酯酶的活性测定参照 Asperene 的方法[19]，取小菜蛾4龄幼虫，加入0.04 mol/L pH7.0磷酸缓冲液在冰浴下进行匀浆并将匀浆液在760 g 下离心10 min，以上清液作酶源。各生物碱处理均设各自的相应对照，作比色调零。用同一批酶液测其蛋白含量（Folin-酚法），以计算酶的比活力。

1.4 酯酶同功酶的测定

参照莽克强聚丙烯酰胺凝胶电泳方法[20]，酶液制备为取小菜蛾4龄幼虫15头，加入1 mL pH7.0的0.04 mol/L 的冰冷的磷酸缓冲液在冰浴下匀浆并将匀浆液在760 g 下离心10 min，取上清液作酶源。处理分两种方式，一种为各处理用缓冲液配制的含不同浓度生物碱的酶液，对照为仅用磷酸缓冲液稀释相同浓度的酶液；另一组均用正常酶液点样。在电泳完毕后，将第一种处理的凝胶直接显色，而将第二种处理的凝胶切开，分别置于以磷酸缓冲液为溶剂配制的500 mg/L 的生物碱溶液中，抑制10 min，然后显色。将显色后的凝胶用清水冲洗，并在7%乙酸溶液中固定、脱色，再用清水冲洗后拍照并用岛津-CS-930双波长薄层扫描仪在470 nm 处扫描该酯酶同功酶分离胶板。

2 结果与分析

2.1 苦豆子生物碱对萝卜蚜的毒力

11种生物碱（9种苦豆子生物碱与两种对照生物碱）对萝卜蚜的毒力如表1。

对表1各处理的相同浓度（1 000 mg/L）48 h 后的结果进行方差分析可知，所试生物碱的单一组分，南开大学提供的槐果碱及氧化苦参碱对萝卜蚜无翅成蚜无效；南开大学提供的苦参碱和宁夏样品槐果碱、槐定碱、槐胺碱、苦参碱和烟碱对试虫毒力较差，而苦豆碱对试虫的毒力高于以上各生物碱。在所试苦豆子生物碱中，以野靛碱对萝卜蚜无翅成蚜的毒力最高，0.1%的浓度48 h 后的死亡率即高达96.7%，与著名杀蚜生物碱毒藜碱处于相同水平（0.1%的毒藜碱对上述试虫48 h 的死亡率为88.33%，经方差分析两者不存在显著性差异）。由此毒力结果可以得出如下结论：苦豆子生物碱中，野靛碱是优异的杀蚜剂，苦豆碱对蚜虫有一定的杀伤效果，而其它的苦豆子生物碱在低于0.1%浓度时，几乎不表现对蚜虫的直接杀伤作用。

表1 苦豆子生物碱对萝卜蚜无翅成蚜毒力* (1994年，广州)

处理及生物碱纯度	生物碱英文名	浓度(mg/L)	24 h死亡率(%)	48 h死亡率(%)
97%槐胺碱	sophoramine	1 000	1.67	13.33 b
		2 000	23.33	36.67
96%野靛碱	cytisine	1 000	65.00	96.67 d
		2 000	95.00	100
98%苦参碱	matrine	1 000	6.67	16.67 b
		2 000	11.67	13.33
97%氧化苦参碱	oxymatrine	1 000	3.33	5.00 a
		2 000	6.67	13.33
95%槐定碱	sophoradine	1 000	6.67	15.00 b
		2 000	5.00	16.67
96%苦豆碱	aloperine	1 000	3.33	43.33 c
		2 000	8.33	45.00
93%槐果碱	sophocarpine	1 000	1.67	18.33 b
		2 000	13.33	15.00
100%苦参碱	matrine	1 000	10.00	10.00 b
(南开)		2 000	16.67	18.33
100%槐果碱	sophocarpine	1 000	1.67	3.33 a
(南开)		2 000	0	10.00
90%毒黎碱	anabasine	1 000	70.00	88.33 d
(sigma)				
95%烟碱	nicotine	1 000	10.00	23.33 b
(广东南雄)		2 000	96.97	98.33
对照			0	4.83 a
			1.67	3.33

* 各处理生物碱除注明者外均为宁夏产；浓度为有效成分；死亡率均为3次重复共60头无翅成蚜的平均死亡率，因对照死亡率低于5%，故各处理死亡率未进行校正；纵列数据后标不同字母者，示方差分析在$F_{0.01}$水平上差异极显著

表2 野靛碱等对萝卜蚜无翅成蚜毒力

(1994年，广州)

生物碱	毒力回归方程 (y=)	相关系数 (r)	$LC_{50}\pm SE$ (mg/L)
野靛碱	$9.9934+3.6921x$	0.9321	432.59±2.12
毒黎碱	$11.3187+5.5021x$	0.9495	684.70±2.28
烟 碱	$13.9479+9.2982x$	0.9670	1 090.65±2.01

苦豆子生物碱中的野靛碱是一个优异的杀蚜剂，故进一步将其与毒黎碱和烟碱进行了毒力比较，结果如表2。

分析表2结果可知，所测3种生物碱对萝卜蚜无翅成蚜的毒力以野靛碱为最高，其次为毒黎碱，而以烟碱的毒力最差。

曾有文报道，很低浓度的野靛碱即影响亚热带粘虫 *Spodoptera eridamia* 的生长发育及存活[21]；Kinghom 等也报道野靛碱抑制豌豆蚜 *Acyrthosiphom pisum* 的生长发育[22]；Mitchell 以马铃薯甲虫作试虫，还证实了野靛碱对 GABA 受体有抑制作用等[23]。本试验证实了野靛碱对萝卜蚜毒力优于毒黎碱和烟碱，这对以后的进一步研究乃至开发新一类杀虫剂有着重要的意义。

2.2　苦豆子生物碱对几种酯酶的影响

2.2.1　苦豆子生物碱对乙酰胆碱酯酶的影响：8种苦豆子生物碱对 AChE 活性影响结果见表3。

对表3结果进行方差分析，各处理间对 AChE 的影响存在极显著差异（实测 F 值为25.26，理论 $F_{0.01}$值为5.47）。经 Duncan's 新复极差测验（SSR 法），苦豆子各生物碱对 AChE 活性抑制程度排序为：总碱＞野靛碱＞槐胺碱＞槐定碱＞槐果碱＞氧化苦参碱＞苦参碱＞苦豆碱。其中对照（A 组）与各生物碱处理间均存在极显著性差异；苦参碱、氧化苦参碱和槐果碱间不存在显著性差异（B 组）；槐定碱、槐胺碱、野靛碱（C 组）和苦总碱（D 组）间（除总碱和槐定碱间）不存在显著性差异；但 B 组和 C 组间存在显著或极显著性差异。此结果显示了各种苦豆子生物碱都不同程度地对 AChE 活性有影响。

表3　苦豆子生物碱对 AChE 活性（体外）

生物碱	浓度 (mg/L)	OD 值* (412 nm)	相对酶活力 (OD/(mg. 30 min))
苦参碱	500	0.310 b	0.28
氧化苦参碱	500	0.298 b	0.26
野靛碱	500	0.226 bc	0.19
总　碱	500	0.201 cd	0.17
槐胺碱	500	0.228 bc	0.20
槐果碱	500	0.290 b	0.25
槐定碱	500	0.271 bc	0.23
苦豆碱	500	0.322 b	0.28
对　照		0.441 a	0.38

* OD 值为两个重复的平均值；纵列数据后标不同字母者，示方差分析在 $F_{0.01}$水平上差异极显著

2.2.2　苦豆子生物碱对 α-乙酸萘酯酶及 α-乙酸萘酯羧酸酯酶的影响：测定结果见表4。

表4　苦豆子生物碱对 α-乙酸萘酯酶及 α-乙酸萘酯羧酸酯酶的活性*（体外）

生物碱	浓度 (mg/L)	α-NA 酶 (OD_{600})	α-萘酚 (mmol/L)	相对酶活力 (mmol α-萘酚/(mg·30min))	α-NA 羧酸酯酶 (OD_{600})	α-萘酚 (mmol/L)	相对酶活力 (mmol α-萘酚/(mg·30 min))
苦参碱	2 000	0.233±0.008 cd	5.74×10^{-3}	0.048	0.502±0.018 d	1.32×10^{-2}	0.11
氧化苦参碱	2 000	0.258±0.023 d	6.43×10^{-3}	0.054	0.557±0.010 e	1.47×10^{-2}	0.12
槐定碱	2 000	0.222±0.013 c	5.44×10^{-3}	0.045	0.490±0.005 d	1.29×10^{-2}	0.11
苦豆碱	2 000	0.095±0.011 b	1.91×10^{-3}	0.015	0.308±0.035 b	0.78×10^{-2}	0.065
槐果碱	2 000	0.268±0.013 de	6.71×10^{-3}	0.056	0.517±0.018 d	1.36×10^{-2}	0.11
槐胺碱	2 000	0.363±0.043 f	9.35×10^{-3}	0.078	0.522±0.010 d	1.38×10^{-2}	0.12
野靛碱	2 000	0.065±0.008 a	1.08×10^{-3}	0.009	0.209±0.008 a	0.51×10^{-2}	0.04
对　照		0.245±0.008 d	6.07×10^{-3}	0.051	0.457±0.010 c	1.20×10^{-2}	0.10

* OD 值均为3个重复的平均值；纵列数据后标不同字母者，示方差分析在 $F_{0.01}$水平上差异极显著

对表4结果进行分析显示，苦豆子几种主要生物碱对昆虫 α-乙酸萘酯酶活性的影响存在极显著差异，其中以野靛碱及苦豆碱对该酶活性抑制程度最强，但槐胺碱对该酶的活性又有刺激作用。苦豆子几种主要生物碱对 α-乙酸萘酯羧酸酯酶的活性影响亦存在极显著性差异，仍以野靛碱和苦豆碱抑制程度最强。而其余所试生物碱对该酶活性却均有不同程度的刺激作用。

为了进一步探讨野靛碱与苦豆碱对该两种酶的活性抑制情况，又对以上两生物碱进行了不同浓度下对羧酸酯酶抑制程度的探讨，并结合对酶液蛋白分析，考察了不同生物碱浓度下的相对酶活力，结果如表5。

表5 野靛碱与苦豆碱对α-NA羧酸酯酶的影响

生物碱	浓度 (mg/L)	α-萘酚 (mmol/L)	相对酶活力 (mmol α-萘酚/(mg·30 min))	比值*
野靛碱	2 000	3.35×10^{-3}	0.028	0.39 a
苦豆碱	2 000	6.58×10^{-3}	0.055	0.72 a
野靛碱	1 000	4.74×10^{-3}	0.040	0.56 b
苦豆碱	1 000	6.86×10^{-3}	0.057	0.75 b
野靛碱	500	5.08×10^{-3}	0.042	0.58 c
苦豆碱	500	7.27×10^{-3}	0.061	0.80 c
野靛碱	250	7.97×10^{-3}	0.066	0.92 d
苦豆碱	250	8.58×10^{-3}	0.072	0.95 d
野靛碱	125	8.30×10^{-3}	0.069	0.96 e
苦豆碱	125	9.02×10^{-3}	0.075	0.99 e
野靛碱	2 000**	0	0	
苦豆碱	2 000**	0	0	
对照		8.63×10^{-3}	0.072	1 f
对照		9.13×10^{-3}	0.076	1 e

* 纵列数据后标不同字母者，示方差分析在$F_{0.01}$水平上差异极显著。两种生物碱各自进行比较；

** 为两种生物碱在失活酶液中的浓度。失活酶即将酶液在80℃水浴中保持10 min，使酶失活

分析表5结果可以看出，野靛碱和苦豆碱对α-乙酸萘酯羧酸酯酶均有显著的抑制作用，且抑制程度随两生物碱浓度的提高而加大，但苦豆碱比野靛碱对该酶活性抑制弱。

2.2.3 苦豆子生物碱对酯酶同功酶的影响：由以上试验结果可以看出，苦豆子生物碱中的野靛碱和苦豆碱对酯酶活性有显著的抑制作用，为此，采取聚丙烯酰胺凝胶电泳法对以上两种生物碱对酯酶同功酶的影响进行了测定，结果见图1、图2。

图1是酶液与生物碱溶液（均用磷酸缓冲液配制）混合后进行的电泳图谱。从图中可以看出，正常酶液（A）有E4、E5、E6、E7、E8和E9六条主酶带及另外一些次要酶带共计20条。但被500 mg/L 的野靛碱处理后，以上对照酶液出现的E4～E9六条主酶带被抑制，且总酶带数(次要酶带被抑制不明显)亦减至14条。被苦豆碱抑制的情况与野靛碱相似(图谱略)，主酶带仅E4、E5和E8亦保留了微弱活性，其余几条酶带均被显著抑制。

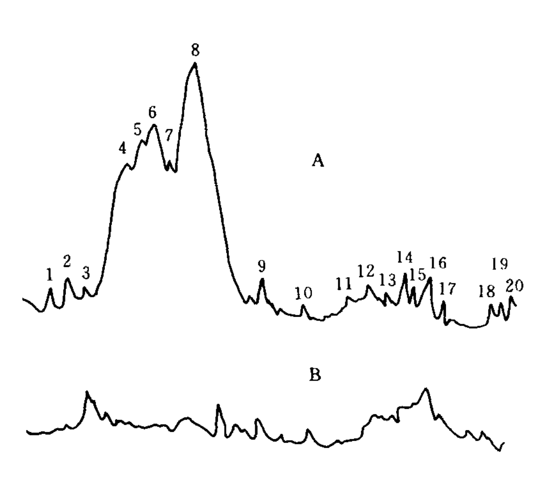


图1 酯酶同工酶电泳图谱扫描图

A 为对照，B 为500 mg/L 野靛碱处理后电泳图谱扫描图

但将正常酶液电泳后，将凝胶切下放以上生物碱溶液处理10 min 后显示的结果却与以上结果有较大差异（图2)。图2中正常酶液的电泳图谱出现E1、E2、E3、E4、E5和E6六条主要酶带(同图1)，将同样电泳的同一块凝胶切开后置两种浓度为500 mg/L 的生物碱溶液中处理10 min（此时对照置磷酸缓冲

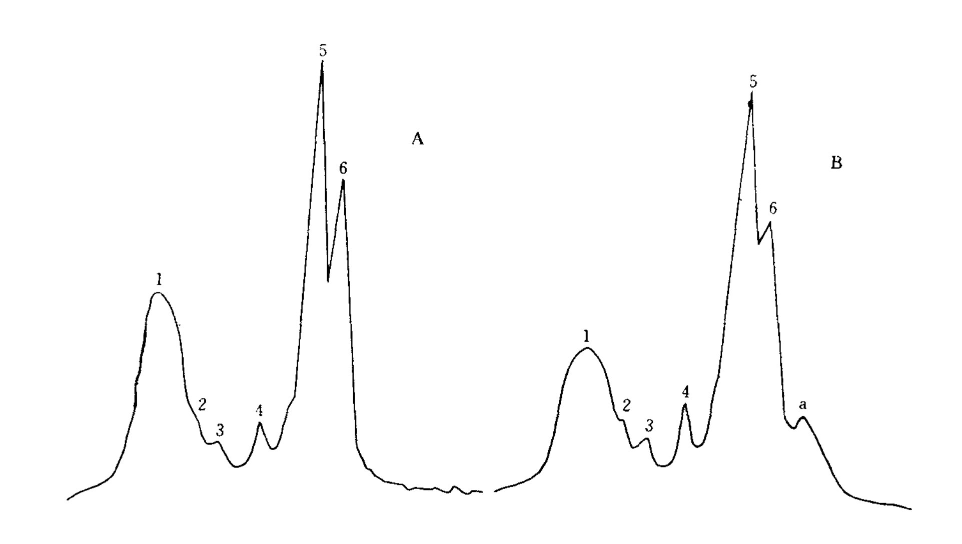


图2　酯酶同工酶电泳图谱扫描图

A 为对照，B 为500 mg/L 野靛碱处理后电泳图谱扫描图（玻璃缸）

液中同样保持10 min）后再显色，6条主酶带均未消失，但主酶带 E6却显著受到了抑制，且两种生物碱两次重复实验均表现了相似的抑制程度。其中野靛碱处理的图谱中在 E6后又出现了一个 Ea，这个新酶带的出现是值得研究的。电泳结果与前面的比色分析结果都说明了野靛碱和苦豆碱对酯酶活性的抑制作用。至于由两种不同的生物碱处理方法在电泳结果中出现的差异，需要在诸如电泳条件和凝胶在生物碱溶液中处理时间等方面进一步研究。

3　讨论与结论

本研究首次明确了苦豆子生物碱中的野靛碱对萝卜蚜有很好的毒杀作用，关于该生物碱的分离和精制已有成功的报道[8]，能否将其作为新一代杀虫剂合成的模板是值得研究的问题。经研究知道苦豆子总碱和野靛碱对在昆虫神经信息传递过程中起重要作用的 AChE 活性有抑制作用。结合文献报道，野靛碱“对呼吸系统的作用类似烟碱，能反射性地兴奋呼吸”[24]及“野靛碱能干扰昆虫正常发育及干扰 GABA 受体引起拒食和忌避作用”等[23,25]，可以认为该生物碱对昆虫的作用机制是多种多样的。

本研究还探讨得出了苦豆子生物碱中的野靛碱和苦豆碱对 α-乙酸萘酯酶和 α-乙酸萘酯羧酸酯酶及酯酶同功酶活性有抑制作用，这个结果给了我们有益的启示。在当前的害虫防治中，抗药性是一个很棘手的问题。害虫产生抗药性的一个重要机理就是体内解毒酶系活性的提高，野靛碱和苦豆碱对酯酶活性特别是对羧酸酯酶活性有抑制作用，这可能对我们探讨昆虫产生抗药性机理和对已产生抗药性害虫的防治有一定意义。

参 考 文 献

1 周立华. 苦豆子 *Sophora alopecuroids* (L.) 生物学特性的研究. 植物学报，1979，**21** (4)：380～382

2 王忠效，张树森等. △″—脱氢苦豆碱的结构. 植物学报，1991，**33** (9)：727～728

3 Georgadzre V N. Pharmacology of the Sophora alkaloids. J. Physiol. 1938，**25**：179～195

4 Ryzhkova V K，Proskurnina N F. Hofman Degradation study of aloperine，an alkaloid from *Sophora alopecuroids*. Khim. Prir. Soedin. Akad. Nauk Uz. SSR.，1965，**3**：194～198

5 Kuchkarov S，Kushmuradov Y K. Alkaloids of *Sophora alopecuroids*. Khim. Prir. Soedin.，1977，(2)：288 (Russ)

6 Kuchkarov S，Kushmuradov Y K *et al*. Alkaloids from *Sophora alopecuroids*. Khim. Prir. Soedin. 1977，(4)：541～544 (Russ)

7 Kuchkarov S，Kishumradov Y K. Lupinine alkaloids from *Sophora alopecuroids*. Khim. Prir. Soedin. 1979，(3)：413～414 (Russ)

8 赵博光，严照金等. 苦豆草生物碱甲苯提取分离生产工艺的研究. 中草药，1979，**11** (8)：350～352

9 王忠效，杜盐平等. 苦豆子 Lehmanine 生物碱的鉴定. 中草药，1985，(2)：44

10 濮全龙，李金宇等. 苦豆草生物碱的质谱研究. 药学学报，1987，**22** (6)：438～444

11 孟家敏. 苦豆子总碱的药理研究. 兰州医学院学报，1983，(1)：1～4

12 陈希元. 苦豆子生物碱抗实验性心律失常的研究. 中国临床药理学杂志增刊，1985，(1)：3～4

13 黎雪茹，戴寿芝等. 苦豆子7种生物碱对小鼠免疫功能的影响. 中草药，1987，**18** (5)：214～215

14 刘国卿，袁惠南等. 槐果碱等苦豆子生物碱对大鼠单胺代谢及多巴胺和5-羟色胺受体的作用. 药学学报，1987，**22** (9)：645～649

15 王永卫. 菜叶蜂及其防治. 新疆农业科学，1962，(5)：191～192

16 中国科学院新疆综合考察队，中国科学院植物研究所. 新疆植被及其利用. 北京：科学出版社，1978，315

17 F. A. O. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides. FAO plant production and protection paper，1980，**21**：25～28

18 Ellman G L. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol.，1961，**7**：88

19 Asperen K Van. A study of housefly esterases by mean of a sensitive colorimetric method. J. Ins. Physiol.，1962，**8**：401

20 莽克强等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 北京：科学出版社，1976

21 Johson N D，Bentley B L. Effects of dietary protein and lupine alkaloids on growth and survivorship of *Spodoptera eridania*. J. Chem. Ecol.，1988，**14** (5)：1 391～1 403

22 Kinghom A D，Manuel F B. Quinolizidine alkaloids of the leguminosae：Structural types，analysis，chemotaxomomy and biological activities. In：Pelletier S W ed. Alkaloids：Chemical and Biological Perspectives. Burlington Hose，London，1984，105～148

23 Mitchell B K. Interaction of alkaloids with galeal chemosensory cells of colorado potato beetle. J. Chem. Ecolo.，1987，**13** (10)：2 009～2 022

24 国家医药管理局中草药情报中心. 植物药有效成分手册. 北京：人民出版社，1986，168

25 Blades D，Mitchell B K. Effect of alkaloids on feeding by *Phormia regina*. Entomologia Experimentalist Applicata，1986，**4** (3)：299～304

THE TOXICITIES OF ALKALOIDS FROM *SOPHORA ALOPECUROIDS* AGAINST TURNIP APHIDS AND EFFECT ON SEVERAL ESTERASES

Luo Wanchun Li Yunshou Mu Liyi

(*Shandong Key Laboratory of Pesticide Toxicology and Applicational Technique, Shandong Agricultural University Taian* 271018)

Chiu Shin-Foon

(*Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University Guangzhou* 510642)

Abstract In this paper, the toxicities of seven quinolizidine alkaloids from *Sophora alopecuroids* against turnip aphids and their effects on several esterases were studied. The results showed that one of the alkaloids cytisine is highly effective against the insect than anabasine and nicotine which are famous aphidcides. The median lethal concentrations of the alkaloids against the apterous aphid are 432.59, 684.70 and 1 090.65 mg/L respectively, 48 h after treatment by dipping method. By means of colorimetry the activities of some esterases treated with the alkaloids were studied. The results indicated that the alkaloids could inhibit activity of acetylcholinesterases (AChE), the effectiveness of inhibiting AChE is: total alkaloids from the plant >cytisine >sophoramine > sophoradine >sophocarpine >oxymatrine >matrine >aloperine. Cytisine and aloperine inhibit the activity of α-NA esterase, α-NA carboxylesterase and esterase isozyme as well.

Key words *Sophora alopecuroids*, quinolizidine alkaloid, turnip aphid, toxicity, esterase